



**DANIELLE RIBEIRO DA SILVA HONORATO**

**TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS:  
UMA REVISÃO DE LITERATURA**

**LAVRAS – MG  
2021**

**DANIELLE RIBEIRO DA SILVA HONORATO**

**TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS: UMA REVISÃO DE  
LITERATURA**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de Bacharel.

Prof (a). Dr (a). Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo  
Orientadora

Mariana Oliveira Mendes  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor (a).

Honorato, Danielle Ribeiro da Silva.  
TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS:  
UMA REVISÃO DE LITERATURA / Danielle Ribeiro da Silva  
Honorato. - 2021.  
35 p.

Orientador(a): Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo.  
Coorientador(a): Mariana Oliveira Mendes.  
TCC (graduação) - Universidade Federal de Lavras, 2021.  
Bibliografia.

1. Purificação. 2. Lipase. 3. Fungos. I. Veríssimo, Lizzy Ayra  
Alcântara. II. Mendes, Mariana Oliveira. III. Título.

**DANIELLE RIBEIRO DA SILVA HONORATO**

**TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS: UMA REVISÃO DE  
LITERATURA**

**TECHNIQUES FOR FUNGAL LIPASES PURIFICATION: A LITERATURE REVIEW**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 18 de maio de 2021

Prof. (a). Dr. (a). Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo UFLA

Ms. Mariana Oliveira Mendes UFLA

M.<sup>a</sup> Ana Cristina Freitas de Oliveira Meira UFLA

Prof. (a). Dr. (a). Isabelle Cristina Oliveira Neves IFMG

Prof. Dr. Jaime Vilela de Resende UFLA

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo  
Orientadora

Mariana Oliveira Mendes  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2021**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus primeiramente, por ter me ajudado a passar e vencer os momentos de dificuldade e conseguir chegar até aqui; à minha família e amigos pelo amor, apoio e carinho; às minhas avós e minha madrinha que foram mulheres inspiradoras, em especial à minha avó paterna por sempre ser incentivadora da educação, e onde quer que estejam sei que estão felizes por mim; aos professores que se dispuseram a me ajudar de diversas formas ao longo da minha graduação, e à minha orientadora e coorientadora.

## RESUMO

Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilglicerol em acilglicerol e ácidos graxos livre. As lipases também possuem função de esterase em ambientes hidrofóbicos, catalisando reações de esterificação e transesterificação (acidólise, alcóolise e interesterificação). Essas enzimas podem ser obtidas a partir de fonte animal, vegetal ou microbiana, sendo os fungos os melhores produtores da enzima. Estas têm vasta aplicação industrial, auxiliando nos processos das indústrias farmacêutica, alimentícia, produção de biodiesel e tratamento de resíduos. O objetivo do trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre as principais técnicas de purificação de lipases fúngicas, abordando os métodos de cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica, precipitação salina e isoelétrica, extração líquido-líquido por Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) e filtração por membranas. A pesquisa foi realizada em bases de dados abordando este tema, além de dissertações, teses, livros, dentre outros. As técnicas de purificação da lipase se fazem necessárias para separar a enzima de outros compostos que não são de interesse, sendo necessário um desenvolvimento contínuo de estratégias de purificação eficientes e baratas. Constatou-se que a extração líquido-líquido com sistema aquoso bifásico é eficiente e de baixo custo para purificação da lipase fúngica. Neste tipo de operação unitária, destaca-se o uso das micelas reversas do tensoativo aniônico bis-2-etilhexil sulfocinato de sódio (AOT) em isoctano para a purificação de lipase produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Verificou-se que os métodos cromatográficos permitem a obtenção das enzimas com um grau de pureza mais elevado, quando comparado com as demais técnicas. No método de filtração por membrana, a ultrafiltração foi a técnica mais empregada para a purificação de lipases fúngicas, sendo em alguns casos combinados com a operação de extração líquido-líquido por sistema aquoso bifásicos, a fim de aumentar o rendimento de purificação. Concluiu-se que os processos de purificação de lipase fúngica abordados neste trabalho são atrativos para aplicação industrial.

**Palavras-chave:** Lipases. Leveduras. Fungos. Extração. Cromatografia. Precipitação. Filtração. Separação.

## ABSTRACT

Lipases (EC 3.1.1.3) are enzymes that catalyze the hydrolysis of triacylglycerol into acylglycerol and free fatty acids. Lipases also have an esterase function in hydrophobic environments, catalyzing esterification and transesterification reactions (acidolysis, alkolysis, and interesterification). These enzymes can be obtained from animal, plant or microbial sources, being fungi the best producers of the enzyme. These enzymes have lots of industrial application as in the pharmaceutical and food industries, biodiesel production and waste treatment. The aim of this work was to present a literature review about the main techniques for purification of fungal lipases, addressing the methods of ion exchange and hydrophobic interaction chromatography, salt and isoelectric precipitation, liquid-liquid extraction by aqueous two phases systems (ATPS) and membrane filtration. The research was carried out in databases covering this topic, as well as theses, books, among others. Lipase purification techniques are necessary to separate the enzyme from other compounds that are not of interest, and a continuous development of efficient and cheap purification strategies is necessary. It was found that liquid-liquid extraction with an aqueous two-phase system is efficient and present low cost for fungal lipase purification. In this type of unit operation, the use of reverse micelles from the anionic surfactant bis-2-ethylhexyl sulfosuccinate (AOT) in isooctane stands out for the purification of lipase from *Aspergillus* and *Penicillium*. It was found that the chromatographic methods allow obtaining the enzymes with a higher degree of purity, when compared to other techniques. Using the membrane filtration method, the ultrafiltration was the most employed technique for the purification of fungal lipases, being in some cases combined with the liquid-liquid extraction operation by aqueous two-phase system. It is concluded that the fungal lipase purification processes discussed in this work are promising for industrial application.

**Keywords:** Lipases. Yeasts. Fungi. Extraction. Chromatography. Precipitation. Filtration. Separation.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de resíduos agroindustriais utilizados como substratos na produção de lipases fúngicas.....	10
Tabela 2 – Exemplos de trabalhos que utilizaram os Sistemas Aquosos Bifásicos para a purificação de lipases fúngicas.....	14
Tabela 3 – Exemplo de alguns trabalhos que empregaram técnicas cromatográficas para a purificação de lipases fúngicas.....	17
Tabela 4 – Exemplos de trabalhos que empregaram a precipitação para a purificação de lipases fúngicas.....	19
Tabela 5 - Principais processos de separação por membranas.....	21



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivos Gerais.....	5
2.2. Objetivos Específicos.....	5
3. METODOLOGIA.....	6
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
4.1. Fungos.....	7
4.2. Lipase.....	7
4.3. Produção de lipase por fungos.....	8
4.3.1. Fermentação.....	8
4.3.2. Substratos.....	9
4.4. Técnicas empregadas na purificação de lipases microbianas.....	11
4.4.1. Extração Líquido-Líquido.....	13
4.4.2. Cromatografia.....	15
4.4.2.1 Cromatografia de troca iônica.....	15
4.4.2.2 Cromatografia de interação hidrofóbica.....	16
4.4.3. Precipitação.....	17
4.4.4. Filtração por membrana.....	19
4.4.4.1. Ultrafiltração.....	20
4.4.5. Micelas Reversas.....	23
4.5. Aplicações das lipases microbianas.....	25
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

## 1 INTRODUÇÃO

As enzimas são macromoléculas proteicas que aumentam as velocidades das reações químicas agindo em substratos específicos, tendo sua atividade influenciada pela ação da temperatura, pH, concentração da enzima e do substrato. Dentre as enzimas utilizadas industrialmente, a lipase se destaca por ser abundante na natureza, além de apresentar alta eficiência na catalisação em meio não aquoso e vasta aplicabilidade em diversos segmentos industriais (TAN *et al.*, 2018; THAKUR, 2012; GANDHI, 1997).

Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ácidos graxos insolúveis em acilglicerol e ácidos graxos livres e, em ambientes hidrofóbicos catalisam reações de sínteses como esterificação e transesterificação (acidólise, alcóolise e interesterificação) (BETTELHEIM *et al.*, 2012). As reações catalisadas pelas lipases podem apresentar especificidade quanto ao substrato, à posição do grupo acila do triglicérido, ao comprimento da cadeia de ácido graxo e à presença de insaturações na cadeia carbônica (CASTRO *et al.*, 2004).

O emprego da lipase se entende em diversos campos que necessitam da hidrólise de lipídeos, como por exemplo, na produção de ésteres para uso na indústria farmacêutica (CRUZ *et al.*, 2015), no tratamento de resíduos hidrolisando óleos poluentes (KUMARI *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2016), e no setor alimentício essa biomolécula pode ser usada na quebra de óleos vegetais (MAROTTI *et al.*, 2017), como emulsificante (GANDRA *et al.*, 2008), na produção de aromas (OLIVEIRA, 2010, MACEDO; PASTORE, 1997), na interesterificação enzimática para produção de gorduras zero *trans* (RIBEIRO *et al.*, 2007) e na obtenção de *shortening* (RODRIGUEZ *et al.*, 2001).

A obtenção de lipase utilizando fontes microbiológicas vem sendo cada vez mais estudadas (TURATI *et al.*, 2018; CAO; LIAO; FENG, 2019; FERREIRA, 2016; CARVALHO *et al.*, 2017; BASHEER e THENMOZHI, 2010), podendo esta ser produzida por bactérias (YELE; DESAI, 2015) ou por células íntegras no micélio de fungos filamentosos. Os maiores produtores de lipase são os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp. e *Rhizomucor* sp. (CORTEZ *et al.*, 2017).

Existem duas formas de obtenção de lipases microbianas, sendo elas: a fermentação submersa ou a fermentação em estado sólido. A escolha do tipo de fermentação depende do microrganismo a ser utilizado, como por exemplo os fungos, que apresentam capacidade de crescimento em fermentações no estado sólido e submerso (PENHA *et al.*, 2016), enquanto

bactérias e leveduras têm facilidade de crescerem em ambientes líquidos (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Em ambos os casos, os resíduos agroindustriais (SALIHU *et al.*, 2012) têm ganhado um papel de destaque como potenciais substratos tanto para a fermentação sólida, na qual ocorre de forma mais lenta, quanto para a fermentação submersa, no qual os nutrientes se encontram diluídos em líquidos e são consumidos rapidamente pelos microrganismos (SUBRAMANIYAM e VIMALA, 2012).

Os fungos filamentosos foram considerados os microrganismos mais adaptados para produção de enzimas em relação à outras espécies de microrganismos estudadas (SALIHU *et al.*, 2012). Dentro desta classe de fungos, destaca-se em número de espécies capazes de produzir lipase os gêneros *Aspergillus* e *Penicilium* (CORTEZ *et al.*, 2017).

O processo de purificação é fundamental na obtenção e aplicação industrial de uma enzima. Nesse sentido, após a fermentação, a enzima se encontra em um meio contendo uma série de outros compostos que não são de interesse (MALDONADO, 2006), sendo necessária a escolha de um processo de purificação enzimática eficiente. Dentre os métodos utilizados para a purificação de lipases, destaca-se as cromatografias de troca iônica e interação hidrofóbica, precipitação salina e isoelétrica, extração líquido-líquido por Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB), micelas reversas e filtração por membranas.

A cromatografia consiste na separação do soluto entre uma fase móvel e outra estacionária. Na cromatografia de troca iônica, essa separação ocorre pela diferença de cargas elétricas entre as moléculas, na qual algumas terão maior afinidade pela fase móvel e outras pela fase estacionária. Já na cromatografia de interação hidrofóbica, a separação entre essas duas fases ocorre pela diferença de hidrofobicidade dos componentes (ZUNIGA *et al.*, 2003). Turati *et al.* (2019) purificaram lipase de fungos do gênero *Penicillium* utilizando a cromatografia de interação hidrofóbica, enquanto Cao; Liao; Feng, (2019) purificaram lipase de fungos do gênero *Trichosporon*, utilizando a cromatografia de troca iônica, na qual ambas as pesquisas obtiveram resultados satisfatórios.

A extração líquido-líquido ocorre quando um solvente líquido extrai um componente de interesse a partir de outra solução líquida. O sistema aquoso bifásico é obtido a partir de duas fases líquidas imiscíveis ou parcialmente miscíveis entre si, podendo ser do tipo polímero-sal, álcool-sal ou polímero-polímero; líquido iônico-sal, líquido iônico-álcool, entre outros (FERRAZ *et al.*, 2018; VENTURA e COUTINHO, 2016).

Lipases de fungos e leveduras como as provenientes de *Aspergillus Niger* (FERREIRA, 2016) e *Yarrowia lipolytica* (CARVALHO *et al.*, 2017) foram purificadas pela

extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos. Ambas os sistemas utilizaram o polietilenoglicol em uma das fases do SAB, sendo alcançados resultados satisfatórios.

A precipitação salina ocorre quando proteínas se encontram em um meio aquoso, onde a adição de sais irá promover neutralização das cargas e redução da camada de hidratação na superfície destas (PESSOA e KILIKAN, 2005; CHANG, 2008; CARVALHO, 2015), provocando a insolubilização da biomolécula no meio, com conseqüente precipitação e purificação.

Na precipitação isoelétrica, o pH da solução é ajustado ao ponto isoelétrico da proteína para que haja uma diminuição das repulsões eletrostáticas e uma solubilidade mínima desta no meio (HARRISON *et al.*, 2003). O ponto isoelétrico é o pH onde a carga elétrica líquida molecular é nula, havendo assim uma mínima repulsão entre as moléculas, favorecendo as interações proteína-proteína (LIMA, 2006) e, como conseqüência, a separação do aglomerado proteico precipitado.

Kamansky (2017) purificou lipases de *Aspergillus niger* utilizando precipitação com sal e precipitação com solventes orgânicos. Como resultados, no teste utilizando NaCl no meio e etanol como solvente orgânico, se obteve um fator de purificação de 9 vezes e um rendimento de 157,31%. Já no teste utilizando NaCl no extrato bruto e acetona como solvente orgânico, foi alcançado um fator de purificação de 11 vezes e rendimento igual a 263,77%.

No método de micelas reversas, as micelas são formadas quando um tensoativo é colocado em um solvente apolar, onde a cabeça polar do tensoativo se volta para o centro enquanto a cauda hidrofóbica fica em contato com o solvente (YANG e ROBB, 2005). Este processo de separação consiste na mistura de uma fase aquosa tamponada com a fase micelar seguida de centrifugação, resultando numa fase aquosa residual e uma micelar. Após feita a mistura dessa fase micelar com uma nova fase aquosa tamponada seguida novamente de centrifugação, é obtida uma fase aquosa e a enzima separada (NEIRA-VIELMA *et al.*, 2020).

A filtração por membrana é um processo em que uma barreira seletiva formada por uma membrana separa um ou mais compostos por filtração, onde a força motriz desse processo pode ser uma diferença de concentração ou de pressão. Dependendo do tamanho da partícula e propriedades físico-químicas, a filtração pode ser classificada como micro, nano ou ultra filtração (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

Basheer e Thenmozhi (2010) purificaram as lipases de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* por micelas reversas e Reinehr *et al.* (2015) utilizaram um módulo de filtração tangencial e membranas de microfiltração e ultra filtração para purificar lipase de *Aspergillus*

*niger*. Ambos os trabalhos obtiveram resultados satisfatórios utilizando esses métodos para purificar lipase fúngica.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo apresentar as principais operações unitárias empregadas na purificação de lipases fúngicas, por meio de uma revisão de literatura.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

O objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica detalhada sobre os principais métodos de purificação de lipases fúngicas.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Abordar aspectos da produção de lipase fúngicas, os substratos empregados, rendimentos e eficiência do processo fermentativo;
- Apresentar algumas áreas de aplicação das lipases microbianas;
- Explicar em detalhes os processos de purificação: cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica, precipitação salina e isoelétrica, extração líquido-líquido por Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) e por micelas reversas e filtração por membranas;
- Apresentar algumas pesquisas sobre purificação de lipases fúngicas, envolvendo as operações unitárias mencionadas anteriormente.

### 3. METODOLOGIA

A pesquisa bibliográfica foi realizada utilizando como base de dados livros, artigos, dissertações, teses, dentre outros materiais considerados importantes. A triagem do material foi realizada afim de selecionar artigos em revistas de alto impacto, citações e publicações atuais, dando suporte à pesquisa. As etapas dessa pesquisa foram:

1ª etapa: Foi definido o tema abordado no trabalho. O tema proposto foi Técnicas de purificação de lipases fúngica: Uma revisão de literatura. Em seguida determinou-se quais as técnicas de purificação de lipase fúngica seriam abordadas e as palavras-chave utilizadas para realizar as pesquisas;

Palavras Chave: Lipases (Lipases); Leveduras (Yeasts); Fungos (Fungi); Extração (Extraction); Cromatografia (Chromatography); Precipitação (Precipitation); Filtração (Filtration); Separação (Separation).

2ª etapa: Utilizando as palavras chave citas foi realizado uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados: Scopus, Scielo, Science Direct, Google acadêmico e em livros de tecnologias emergentes de processamento de alimentos.

3ª etapa: Foi feita uma seleção do material encontrado: artigos, em especial os mais atuais e publicados em revistas de alto impacto e com maiores citações.

4ª etapa: Realizou-se uma avaliação dos materiais selecionados: leitura e seleção dos artigos mais relevantes ao tema proposto.

5ª etapa: Foi feita uma síntese e organização das informações: resumo das informações contidas nos artigos, teses e dissertações. Redação da monografia.

## 4. REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1. Fungos

Fungos são organismos eucariotos podendo ser unicelulares (leveduras, quitrídias) ou multicelulares, possuindo normalmente dois núcleos em suas células. São seres heterotróficos que obtêm energia através da degradação de material orgânico presente na natureza. Essa degradação ocorre quando eles colonizam o material orgânico (substrato) e secretam enzimas que tem por função promover a quebra de moléculas deste material. Essas moléculas serão absorvidas através da parede e membrana celular fúngica, sendo utilizadas para seu metabolismo normal (SILVA e COELHO, 2006).

Dentre as várias enzimas passíveis de serem secretadas por fungos, destaca-se neste trabalho, as lipases. As cepas de fungos possuem um grande potencial de produção de lipase, variando de acordo com a cepa e o substrato utilizado para o crescimento, produzindo lipases com propriedades catalíticas importantes para uma diversidade de aplicações comerciais (PANDEY *et al.*, 2016).

### 4.2. Lipase

Lipases são triacilglicerol-acil hidrolases (E.C. 3.1.1.3) que catalisam a hidrólise do triacilglicerol convertendo-o em glicerol e ácidos graxos. Segundo Thakur (2012), as lipases são encontradas com abundância na natureza e produzidas tanto por plantas (PAQUES & MACEDO, 2006), animais (LOWE, 2002) e microrganismos (COLLA; REINEHR; COSTA, 2012; MESSIAS *et al.*, 2011).

Nesse contexto, as lipases, assim como as outras enzimas, possuem a capacidade de aumentar a velocidade de uma reação específica, provocando o aumento da taxa de conversão de um determinado substrato em um produto (DEVLIN, 2011). Devido à grande variedade de reações capazes de serem catalisadas, com alta eficiência catalítica e alta especificidade com o substrato, as enzimas são consideradas catalisadores que resultam em menores problemas ambientais e de toxicidade quando comparadas com catalisadores químicos (SANTOS, 2007).

As lipases possuem alta eficiência nas reações de catalisação em meio não aquoso devido à sua estabilidade em altas temperaturas, pH e solventes orgânicos (TAN *et al.*, 2018). Além disso, apresentam um grande potencial de uso em vários segmentos industriais que



trabalham com óleo e sua transformação, como por exemplo indústrias alimentícias (MEHTA *et al.*, 2021), farmacêuticas (LEONAVICIUTE *et al.*, 2016), na produção de biocombustíveis (WANCURA *et al.*, 2019; SAHOO *et al.*, 2016) e no tratamento de águas residuais (SARAC e UGUR, 2016; SALIHU *et al.*, 2012).

### **4.3. Produção de lipase por fungos**

A lipase microbiana é produto da fermentação de microrganismos em um substrato. A produção desta enzima a partir de resíduos agroindustriais é uma ótima alternativa biotecnológica devido à sua abundância, apresentar baixo custo, além de não causar danos ambientais (SALIHU *et al.*, 2011). A fermentação deste microrganismo em um substrato pode ocorrer tanto por meio da fermentação semi-sólida/sólida ou submersa.

#### **4.3.1. Fermentação**

A produção da lipase fúngica pode ocorrer por fermentação submersa ou por fermentação semi-sólida, segundo Pinto *et al.* (2005) também chamada de fermentação sólida ou em estado sólido (SANTOS *et al.*, 2019; ROVEDA *et al.*, 2010; REINEHR, 2015; BONINE, 2011; SANTOS *et al.*, 2018). Os processos fermentativos para produção de lipases fúngicas, assim como a grande maioria dos processos fermentativos, são realizados de forma aeróbica, e esse oxigênio é inserido no processo por meio de aeração ou agitação do meio fermentativo (ALONSO, 2001).

O processo de fermentação sólida/semi-sólida utiliza um substrato com baixa quantidade de água. As vantagens desse processo são: baixo custo da matéria-prima, possibilidade de se obter uma enzima mais concentrada, e menor chance de contaminação do meio, por haver um baixo teor de umidade; enquanto que as principais desvantagens observadas para esse tipo de fermentação são: meio com baixo grau de homogeneização, necessidade do substrato passar por um pré-tratamento para eliminar possíveis contaminações, dificuldade de medidas de pH, temperatura e umidade do meio, maior custo de mão de obra para operação do equipamento em escala industrial (ALONSO, 2001; COUTO & SANROMÁN, 2006; MARTINS, 2001 citados por PINHEIRO, 2006).

Já a fermentação submersa consiste em um meio na sua forma líquida, onde os nutrientes são solúveis (FEITOSA, 2009), e este tipo de fermentação é o mais utilizado para a

produção de lipases produzidas por fungos (ALONSO, 2001; MARTINS, 2001 citado por PINHEIRO, 2006). As maiores vantagens observadas foram: homogeneidade do meio de fermentação, facilidade no controle de parâmetros do processo como temperatura e pH por sensores; tem como desvantagens: alta possibilidade de contaminação pelo elevado teor de água, obtenção de uma enzima extracelular muito diluída necessitando um processo de concentração mais trabalhoso, alto custo dos meios utilizados (COUTO & SANROMÁN, 2006; ALONSO, 2001; FEITOSA, 2009; PINHEIRO, 2006).

O tipo de microrganismo irá definir qual tipo de fermentação é mais eficiente para o uso. Fungos apresentam boa capacidade de crescimento tanto em fermentações no estado sólido e submerso (PENHA *et al.*, 2016), enquanto bactérias e leveduras têm facilidade de crescimento em ambientes líquidos (OLIVEIRA *et al.*, 2013), sendo mais apropriada a fermentação submersa.

Com relação a produção de lipases fúngicas, tanto a fermentação submersa (SANTOS *et al.*, 2019; ROVEDA *et al.*, 2010) quanto a fermentação sólida / semi-sólida se mostraram eficientes (REINEHR, 2015; BONINE, 2011; SANTOS *et al.*, 2018), com os autores obtendo bons rendimentos na produção desta enzima.

Roveda *et al.* (2010) conseguiram produzir lipase fúngica utilizando fermentação submersa, dentre os fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Fusarium*,) os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram os que conseguiram maiores atividades enzimáticas em fermentação submersa. Souza *et al.* (2019) concluíram que as condições de maior atividade enzimática do fungo *Aspergillus terreus* foram nas condições de 45 °C, pH 11, 4,5% de substrato, 150 rpm de agitação, 8 dias e incubação à 25 °C.

Reinehr (2015) e Santos *et al.* (2018) também concluíram que a fermentação em estado sólido gera bons resultados para produção desta enzima com o fungo *Aspergillus niger*. Bonine (2011) obteve bons resultados para produção da lipase do fungo *Myceliophthora sp.* por fermentação sólida, até mesmo melhores do que por fermentação submersa.

#### **4.3.2. Substratos**

Estudos revelaram a viabilidade do uso de resíduos agroindustriais como fonte de nutrientes ou como suporte para imobilizar enzimas (KHOOTAMA, PUTRI e HERMANSYAH, 2018; RAVINDRAN *et al.*, 2018). De acordo com o estudo de Salihi *et al.* (2012), os resíduos que mostraram ser mais eficientes como substrato para produção de

lipases por fungos filamentosos foram farelos de trigo, soja e cevada, bolos de óleo de azeitona, gengibre, babaçu, amendoim e pinhão manso, resíduos de mamona, matadouros e bagaço de cana (SALIHU *et al.*, 2012), além de farelo de trigo e espiga de milho suplementados com azeite de oliva (DAMASO *et al.*, 2008).

Na Tabela 1, encontra-se alguns exemplos de resíduos agroindustriais utilizados nos processos fermentativos para a síntese de lipase a partir de fungos.

Tabela 1 – Exemplos de resíduos agroindustriais utilizados como substratos na produção de lipase fúngica.

Resíduo	Fungos Utilizados	Meio de Fermentação	Autores
Agroindustrial			
Óleos provenientes da fabricação de azeite de oliva	Gêneros <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Trichoderma</i> e <i>Fusarium</i>	Efluente de laticínios coletado nas saídas do equalizador e do aerador do sistema de tratamento, adicionados de 0,1% de nitrato de sódio (NaNO <sub>3</sub> ), 0,1% de fosfato de potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), 0,05% de sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) e 1% de azeite de oliva como indutor, em pH 6,5.	ROVEDA, HEMKEMEIE R e COLLA (2010)
Farelo de trigo e sabugo de milho enriquecidos com óleo de oliva	<i>Aspergillus niger</i>	100 g de farelo de trigo ou sabugo de milho umedecido com 60 mL de 0,91% (p / v) da solução de sulfato de amônio (pH 7) e das fontes lipídicas: azeite de oliva nas concentrações (2, 4, 8 e 12% p / p) ou subprodutos industriais do refino de óleo de milho (4% (p / p)).	DAMASO <i>et al.</i> (2008)
Torta de dendê (palmiste) e da borra	<i>Aspergillus niger</i>	100 g de torta de dendê (massa seca), umidificada com 80mL de	PENHA <i>et al.</i> (2016)

alcalina do refino do óleo de dendê (borra de dendê)		solução salina (NaCl 0,85%), pH 7,0, ou 80mL de solução de sulfato de amônio (1,2% m/v), pH 7,0, e adicionado ou não de indutores (borra alcalina) na concentração de 3% (m/m).	
Efluente de moinho de óleo de palma	<i>Fusarium solani</i>	Extrato de malte, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub> , azeite, peptona, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaNO <sub>3</sub> , Tween-80, efluente da fabricação de óleo de palma.	GEOFFRY e ACHUR (2018)

Fonte: Do autor (2021).

Segundo Cortez *et al.* (2017), os maiores produtores de lipase são os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp. e *Rhizomucor* sp. Nesse contexto, um estudo realizado por Roveda, Hemkemeier e Colla (2010), concluiu que fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram os que apresentaram maiores atividades enzimáticas dentre as 21 cepas de fungos isolados a partir de efluentes de laticínios pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Fusarium*.

As condições ideais de atuação das lipases fúngicas variam de acordo com a espécie do microrganismo e meio de fermentação, como foi mostrado na Tabela 1. O extrato enzimático do *Penicillium verrucosum*, por exemplo, apresentou condição ideal de atividade na faixa de temperatura de 30 a 40 °C em pH 7,0 (PINHEIRO *et al.*, 2008). Por outro lado, a lipase produzida a partir do *Aspergillus niger*, na sua forma em pó, apresentou condições ideais de atividade a 30 °C, não sendo especificada a faixa de pH (UTAMI *et al.*, 2017). Para o *Aspergillus terreus*, sua lipase purificada foi mais ativa em pH 6,0, na temperatura de 50 °C (SETHI; NANDA; SAHOO, 2016).

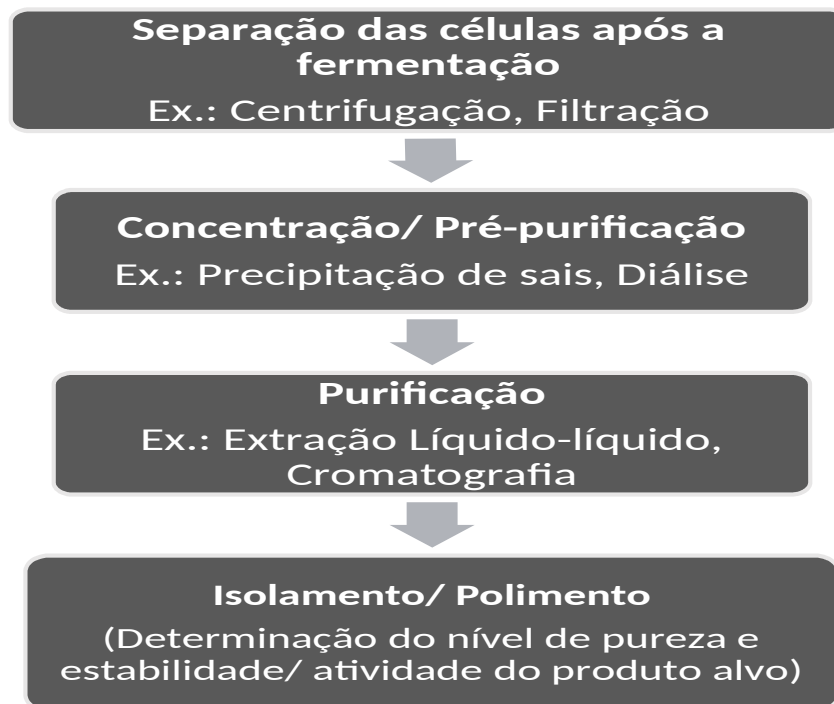
#### 4.4. Técnicas empregadas na purificação de lipases microbianas

Após o processo de fermentação, a enzima se encontrará em um meio contendo vários outros compostos que não são de interesse (MALDONADO, 2006). Para separar a enzima destes outros produtos fermentativos, faz-se necessário o emprego da purificação.

As etapas do processo de purificação da lipase microbiana dependerão do local onde o conteúdo foi produzido, podendo ser no interior ou exterior das células microbianas. Para uma enzima que foi produzida fora da célula, o meio de reação pode ser diretamente concentrado e o produto purificado. Por outro lado, se o processo ocorreu no interior celular, será necessário o rompimento da célula microbiana para liberar o produto, sendo este seguido pela separação da enzima dos detritos (VENTURA e COUTINHO, 2016).

Segundo Ventura e Coutinho (2016), os passos que envolvem o processo de purificação do composto de interesse, no geral, são (Figura 1):

Figura 1 – Processo de purificação da lipase microbiana:



Fonte: Adaptado de VENTURA e COUTINHO, (2016).

O fator de purificação (FP) da enzima é a razão entre a atividade específica da lipase purificada e a atividade específica de lipase bruta (Equação 1) (BIAZUS *et al.*, 2010). A recuperação da enzima (REC) diz respeito à razão entre as atividades da enzima e seu volume na forma bruta e purificada (Equação 2) (PORTO *et al.*, 2008).

$$FP = \frac{\text{Atividade específica da lipase purificada}}{\text{Atividade específica da lipase bruta}} \quad (1)$$

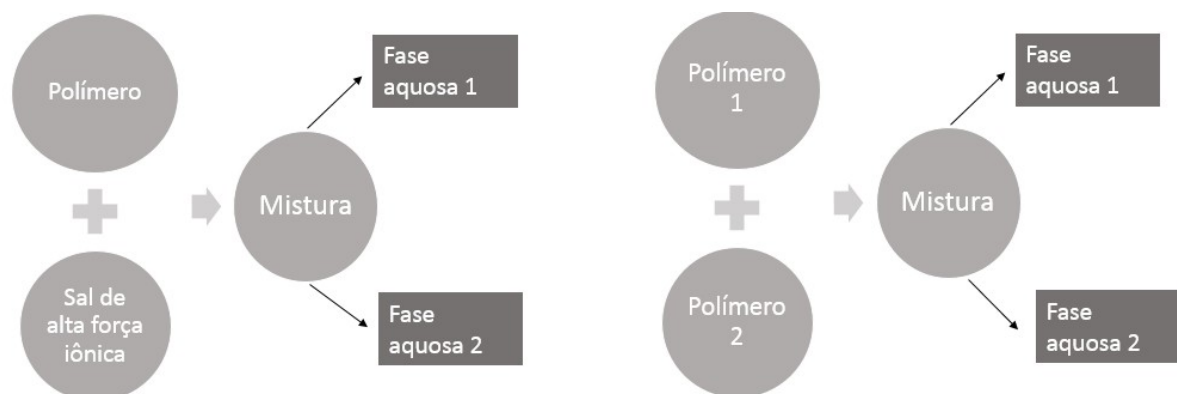
(2)

$$REC = \frac{(Atividade\ da\ enzima\ purificada \times Volume\ purificado)}{(Ativ.\ enzima\ alimenta\c{a}\tilde{o}\ (extrato\ bruto) \times Vol.\ inicial\ do\ extrato\ adicionado)}$$

#### 4.4.1. Extração Líquido-Líquido

A extração líquido-líquido é um processo em que uma solução líquida extrai o componente de interesse presente em outra solução líquida. Como representado na Figura 2, o sistema aquoso bifásico (SAB) é normalmente descrito como sistemas resultantes da junção entre soluções de dois polímeros, ou um polímero e um sal de alta força iônica, que são incompatíveis. Quando dois polímeros são misturados, forma-se agregados grandes alterando sua afinidade pelas moléculas e, portanto, tendem a se separar em duas diferentes fases aquosas. Essa mesma separação em duas fases também ocorre quando um polímero é misturado com uma alta concentração de sal, na qual esse sal irá interagir com as moléculas de água presentes, promovendo a separação de fases (FERRAZ *et al.*, 2018; VENTURA e COUTINHO, 2016).

Figura 2 – Representação do Processo de Extração líquido-líquido por Sistemas aquosos bifásicos:



Fonte: Do autor (2021).

O processo de purificação de lipases fúngicas por sistemas aquosos bifásicos vem se mostrando cada vez mais eficiente. Na purificação da lipase produzida pela levedura *Yarrowia lipolytica*, Carvalho *et al.*, (2017) purificaram a enzima em uma única etapa utilizando o polietilenoglicol e fosfato de potássio. Já Duarte *et al.*, (2015) testaram três sistemas diferentes como micelares, polietilenoglicol e sais de fosfato e polietilenoglicol e ácido poliacrílico, para purificação da lipase do *Leucosporidium scottii*. Como resultados, os

sistemas micelares apresentaram um melhor resultado para extração da enzima em comparação aos outros dois.

Levando em consideração que a purificação é a etapa mais cara do processo de produção da lipase, novas formas de purificação com um menor custo devem ser estudadas (VENTURA e COUTINHO, 2016). Em uma pesquisa realizada para purificar a lipase de *Penicillium candidum*, concluiu-se que o processo utilizando o sistema aquoso bifásico promoveu uma recuperação primária de lipase a um baixo custo (ALHELLI *et al.*, 2016), se tornando um método de purificação viável economicamente para essa enzima.

Na etapa de purificação das enzimas de origem microbiana ou fúngica, um fator a se considerar juntamente com a faixa de pH e temperatura, é a concentração das soluções de separação, uma vez que também interfere na eficiência do processo e vem sendo estudada recentemente (BHARATHI e RAJALAKSHMI, 2019).

A Tabela 2 mostra os parâmetros ideais do processo de purificação utilizando o sistema aquoso bifásico para a purificação da lipase fúngica.

Tabela 2 – Exemplos de trabalhos que utilizaram os Sistemas Aquosos Bifásicos para a purificação de lipases fúngicas.

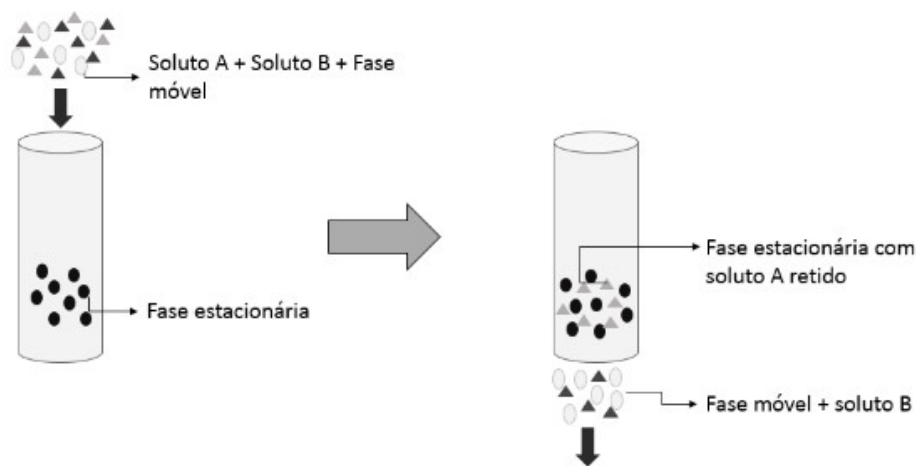
Espécie fúngica produtora da lipase	Condições ótimas avaliadas para o processo	Sistema aquoso bifásico utilizado	Autores
<i>Yarrowia lipolytica</i>	pH: 6 a 7 Temperatura: 35 a 40°C	Polietilenoglicol (PEG) e fosfato de potássio	Carvalho <i>et al.</i> , 2017
<i>Penicillium candidum</i>	Concentrações: 13,8% (p/p) de tampão fosfato, 9,2% (p/p) de PEG-3000 e 3,3% (p/p) de NaCl. Temperatura: 25°C	Polietilenoglicol (PEG) e NaCl	Alhelli <i>et al.</i> , 2016
<i>Leucosporidium scottii</i>	pH: 3 a 8 Temperatura: 40°C	Sistemas micelares de duas fases aquosas (ATPMS)	Duarte <i>et al.</i> , 2015

Fonte: Do autor (2021).

#### 4.4.2. Cromatografia

Para um melhor grau de purificação de moléculas, diferentes processos cromatográficos são utilizados, como a cromatografia de troca iônica, filtração em gel e cromatografia de afinidade (VENTURA e COUTINHO, 2016; GAUR e KHARE, 2017). Na Figura 3, está representado o esquema geral de um processo de purificação por cromatografia:

Figura 3 – Representação do Processo de Cromatografia:



Fonte: Do autor (2021).

##### 4.4.2.1 Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica é um método de separação amplamente empregado na purificação de biomateriais, como aminoácidos e proteínas (YAMAMOTO; NAKANISHI; MATSUNO, 1998). Essa técnica é considerada simples, com alta resolução, boa eficiência de purificação e, ainda, realiza separações sob condições não desnaturantes (ANDERSEN *et al.*, 2004; JINZENJI, 2008).

O princípio da cromatografia de troca iônica baseia-se no processo de troca de íons envolvendo a fase móvel e grupos de troca iônica que ficam ligados ao material do suporte (fase estacionária). Com o intuito de separar íons, as colunas são classificadas como colunas de troca catiônica ou aniônica, sendo utilizadas soluções diluídas de íons como eluentes para separá-los segundo sua natureza (SARZANINI, 1999). Na purificação de proteínas, o tipo de trocador de íons (aniônico ou catiônico) vai depender da estabilidade da proteína em função do pH do meio no qual está inserida (PESSOA e KILIKIAN, 2005).



A cromatografia de troca iônica é comumente utilizada devido ao estabelecimento de fortes interações eletrostáticas entre a enzima e as resinas de troca iônica, possibilitando um alto grau de purificação (KRIEGER *et al.*, 1999; VENTURA e COUTINHO, 2016). Os trocadores de íons mais empregados são os dietilaminoetil (DEAE) na troca aniônica e o grupo carboximetil na troca catiônica (GAUR e KHARE, 2017).

#### 4.4.2.2 Cromatografia de interação hidrofóbica

Na cromatografia de interação hidrofóbica, há uma fase estacionária que contém agentes ligantes hidrofóbicos capazes de reter as moléculas hidrofóbicas presentes na fase móvel. Essa força de interação entre as moléculas e os agentes ligantes depende de fatores como a densidade dos grupos hidrofóbicos presentes na superfície da biomolécula, o tipo e o grau de substituição dos ligantes hidrofóbicos que estão na matriz polimérica (fase estacionária) (JANSON e RYDÉN, 1993).

Nesse tipo de cromatografia, as interações são potencializadas na presença de sais que favorecem a precipitação de proteínas. A adsorção ou a dessorção das proteínas irá ser favorecida dependendo da concentração de sal da fase móvel. Uma fase móvel com alta concentração salina adsorverá as proteínas, enquanto uma diminuição da concentração salina irá favorecer o processo de dessorção (MELANDER e HORVÁTH, 1977; FAUSNAUGH e REGNIER, 1986; ROE, 1989; RADKE, 2013).

Já a cromatografia de afinidade é mais aplicada em um estágio inicial da purificação devido ao alto custo dos materiais que são requeridos. Desta forma, a cromatografia de filtração em gel ou a cromatografia de troca iônica são preferencialmente utilizadas devido aos custos mais baixos de seus materiais (VENTURA e COUTINHO, 2016).

A cromatografia de filtração em gel, mesmo possuindo baixo grau de purificação, pode ser aplicada como etapa inicial de concentração ou na contribuição final para o produto ou polimento (VENTURA e COUTINHO, 2016). Nesse contexto, pode ser observado nos trabalhos de Ulker e Karaoğlu (2012) e Shu, Yang e Yan, (2007), que os autores utilizaram as técnicas de cromatografia de filtração em gel combinadas com cromatografia de troca iônica e cromatografia de troca aniônica. Em seus trabalhos, os autores conseguiram bons resultados na otimização dos parâmetros pH e temperatura para a purificação da lipase dos fungos *Mucor hiemalis* f. *corticola* e *Aspergillus niger* utilizando as técnicas de purificação citadas acima. Turati *et al.* (2019) purificaram lipases fúngicas de *Penicillium* utilizando a

cromatografia de interação hidrofóbica obtendo resultados satisfatórios, uma vez que a técnica empregada é considerada bastante eficiente para purificar lipases com grandes superfícies hidrofóbicas (GAUR e KHARE, 2017).

Em outros trabalhos consultados, também foi possível observar que o tipo de cromatografia mais utilizado para a purificação de lipase fúngica foi a cromatografia de troca iônica (ULKER e KARAOĞLU, 2012; SHU; YANG; YAN, 2007; CAO; LIAO; FENG, 2019; TRODLER *et al.*, 2008).

Na Tabela 3 são apresentados alguns trabalhos em que foram empregadas técnicas cromatográficas para a purificação de lipases fúngicas.

Tabela 3 – Exemplo de alguns trabalhos que empregaram técnicas cromatográficas para a purificação de lipases fúngica.

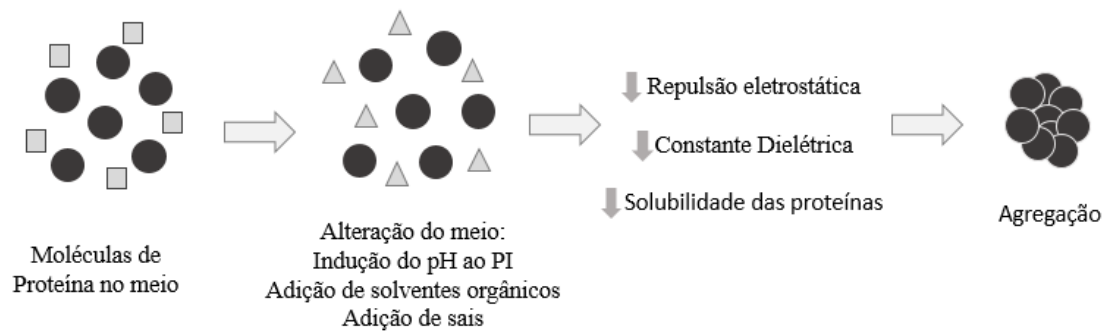
Fungo produtor da lipase	Tipo de cromatografia	Autores
<i>Mucor hiemalis</i>	cromatografia de filtração em gel e	ULKER e KARAOĞLU, 2012
<i>f. corticola</i>	cromatografia de troca iônica	
<i>Aspergillus niger</i>	cromatografia de troca aniônica e	SHU; YANG; YAN, 2007
<i>Trichosporon sp</i>	cromatografia de filtração em gel e	
	cromatografia de troca aniônica	CAO; LIAO; FENG, 2019
<i>Candida antarctica</i>	cromatografia de troca iônica	TRODLER <i>et al.</i> , 2008
<i>Penicillium sp</i>	cromatografia de interação hidrofóbica	TURATI <i>et al.</i> , 2019

Fonte: Do autor (2021).

#### 4.4.3. Precipitação

A precipitação é um dos processos usados para purificar biomoléculas, servindo para separar e recuperar proteínas solúveis. O processo de separação e recuperação ocorre por meio da utilização de substâncias que tem capacidade de interagir com as ligações de hidrogênio das moléculas de proteína, fazendo com que estas possam se aglomerar diminuindo assim seu volume (Figura 4). A precipitação é muito utilizada na indústria como uma etapa inicial do processo de purificação por ser considerada um método simples (ZUÑIGA *et al.*, 2003).

Figura 4 – Representação do Processo de Precipitação:



Fonte: Do autor (2021).

A precipitação isoelétrica de proteínas, é uma técnica ao qual o pH da solução é induzido ao seu ponto isoelétrico (carga global da proteína nula), para que ocorra uma diminuição das repulsões eletrostáticas e uma solubilidade mínima (HARRISON *et al.*, 2003). A repulsão eletrostática é reduzida quando o pH do meio se aproxima do ponto isoelétrico da proteína, causando uma agregação. Essa agregação formará uma concentração do produto que se encontrará parcialmente purificado e de fácil recuperação (WALSH e HEADON, 1994).

A precipitação de proteínas pela adição de solventes orgânicos ocorre devido à redução da constante dielétrica do meio em que está contida, promovendo assim a interação de suas cargas e, conseqüentemente, agregação das proteínas. Para evitar uma desnaturação proteica causada pelos solventes, pode ser adotada a redução da temperatura para valores em torno de 0 °C, já que, com o objetivo de diminuir a flexibilidade das biomoléculas, faz-se com que diminua a capacidade de penetração do solvente nas enzimas (BOHÓRQUEZ, 2014; PESSOA e KILIKIAN, 2005).

O princípio da precipitação salina, envolve o uso de sais no qual leva a uma diminuição da solubilidade das proteínas. Isto ocorre porque os sais dissociados interagem com as moléculas de água de forma que ocorrerá uma remoção da camada de água envolta da proteína favorecendo a interação proteína-proteína (“*salting-out*”). Por estar presente nas duas fases que se formam, são necessárias outras operações de purificação para a eliminação desse sal (PIOVANI; MARINHO; WATANABE, 2014).

Preczescki (2017) concentrou lipases de *Aspergillus niger* por precipitação salina e solventes orgânicos, aplicando-as na hidrólise de óleo residual de fritura. Obtiveram os melhores fatores de purificação para a precipitação utilizando o solvente acetona em uma vazão de 19,24 mL/min, a uma concentração de 50%, adicionado de 0,5 mol/L de NaCl. Ao utilizar o álcool etílico como solvente, o autor verificou que o melhor fator de purificação foi

obtido para a vazão de 0,76 mL/min, em 50% de solvente e com 0,5 mol/L de NaCl. Além disso, o melhor rendimento utilizando acetona foi de 263,78% e de 157,31% para o etanol.

Outros trabalhos que utilizaram a precipitação salina e/ou por adição de solventes para a purificação de lipases fúngicas são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Exemplos de trabalhos que empregaram a precipitação para a purificação de lipases fúngicas.

Espécie fúngica produtora da lipase	Tipo de precipitação	Substâncias utilizadas	Rendimento/ Fator de purificação/ Recuperação	Autores
<i>Rhizopus oryzae</i>	Solvente orgânico	Acetona (80%)	Fator de purificação de 160 e Recuperação de 64%	KRIEGER <i>et al.</i> , (1999); CHAHINIAN <i>et al.</i> , (2000);
<i>Penicillium cyclopium</i>	Salina	Sulfato de amônio	Fator de purificação de 590 e Recuperação de 30%	RAZAK <i>et al.</i> , (1997)
<i>Penicillium citrinum</i>	Salina	Sulfato de amônio	Recuperação de 15,2% e Fator de purificação de 379	

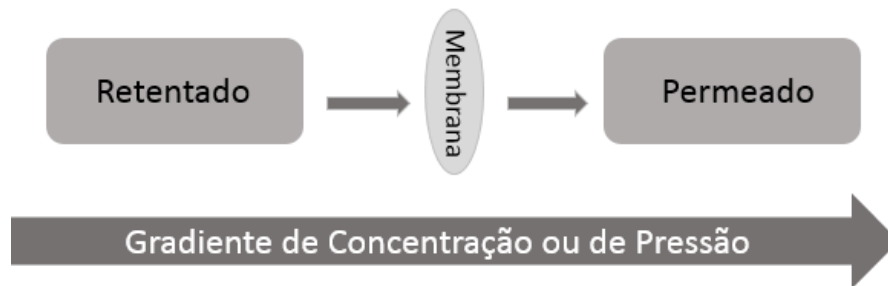
Fonte: Do autor (2021).

#### 4.4.4. Filtração por membrana

Filtração por membrana é uma tecnologia que utiliza uma barreira semipermeável que filtra as partículas separando um ou mais compostos em que, a fração que ultrapassa a barreira é chamada de permeado e a que fica retida é chamada de retentado (WANKAT, 2006).

Essa barreira semipermeável é uma membrana. Para o processo de separação acontecer deve-se haver uma força motriz para promover a passagem da substância através dessa membrana, em que essa força pode ser um gradiente de concentração ou de pressão (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006). A Figura 5 esquematiza resumidamente o processo de filtração por membranas:

Figura 5 – Representação do Processo de Filtração por Membranas:



Fonte: Do autor (2021).

As vantagens da filtração por membrana em relação a outros métodos de purificação, observadas por Habert, Borges e Nóbrega, (2006) foram: alta seletividade; realização do processo em temperatura ambiente, não alterando substâncias sensíveis a temperatura; e operação simples.

#### 4.4.4.1. Ultrafiltração

Assim como os outros tipos de filtração, na ultrafiltração é usado uma membrana onde ocorre a separação de um composto. No entanto, neste caso, as membranas atuam através da pressão com valores adequados de operação transmembrana inferiores a 10 bar, com o diâmetro de poros das membranas variando entre 0,05  $\mu\text{m}$  e 0,001  $\mu\text{m}$ , retendo partículas com massa molar entre 300 e 500.000 Daltons (BOSCHI, 2006; MULDER, 1996; BALDASSO, 2008). Essas membranas retêm, por exemplo, gorduras, emulsões, proteínas, lactose e polímeros coloidais (PEPPIN e ELLIOT, 2001).

Devido à grande importância do tamanho dos poros da membrana neste processo, a escolha adequada desta se faz necessário para evitar o “*fouling*”, nome dado ao fenômeno que ocorre devido ao acúmulo de matéria orgânica e formação de torta bacteriana, causando entupimento da membrana e, conseqüentemente, a queda no fluxo de permeado (MENG *et al.*, 2009).

Diferentes tipos de processos de filtração por membrana requerem forças motrizes diferentes, como também irão reter ou permear substâncias com tamanhos de partículas e propriedades físico-químicas distintas. Nesse contexto, esses processos são usados para aplicações diferentes, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 – Principais processos de separação por membranas

Processo	Força	Material Retido	Material que	Aplicações
----------	-------	-----------------	--------------	------------

	Motriz		permeia	
Ultrafiltração (UF)	$\Delta P$ (1 -7 atm)	Colóides, macromoléculas. Massa molar > 5000 Da	Água (solvente), sais solúveis de baixa massa molar.	Fracionamento/ concentração de proteínas, recuperação de pigmentos/óleos.
Nanofiltração (NF)	$\Delta P$ (5 -25 atm)	Moléculas de massa molar média 500 < MM < 2.000 Da.	Água, sais e moléculas de baixa massa molar	Purificação de enzimas; bioreatores a membrana.
Osmose Inversa (OI)	$\Delta P$ (15 - 80 atm)	Todo material solúvel ou em suspensão.	Água (solvente).	Dessalinização de águas; concentração de suco de frutas; desmineralização de águas.
Diálise (D)	$\Delta C$	Moléculas de massa molar > 5.000 Da.	Íons e orgânicos de baixa massa molar	Hemodiálise; rim artificial; recuperação de NaOH.
Eletrodialise (ED)	$\Delta E$	Macromoléculas e compostos não iônicos	Íons.	Concentração soluções salinas; purificação de águas
Permeação de gases (PG)	$\Delta P \Rightarrow \Delta C$	Gás menos permeável	Gás mais permeável.	Recuperação de hidrogénio; separação CO/ CH <sub>4</sub> ; fracionamento do ar.
Pervaporação (PV)	Pressão de vapor	Líquido menos permeável.	Líquido mais permeável.	Desidratação de álcoois; eliminação de VOC da água.

Fonte: HABERT; BORGES; NÓBREGA, (2006).

Li *et al.* (2019), purificaram lipase extracelular de *Aureobasidium pullulans* usando ultrafiltração e obtendo uma enzima capaz de hidrolisar vários tipos de óleos comestíveis. Já

Reinehr *et al.* (2015), separaram e concentraram lipase de *Aspergillus niger* por processos sequenciais de separação utilizando um módulo de filtração tangencial e membranas de microfiltração e ultrafiltração, obtendo resultados promissores.

Em alguns casos pode ser feito uma combinação da filtração por membrana com outro método de purificação. Santos *et al.* (2015) purificaram parcialmente a lipase produzida por *Yarrowia lipolytica*, por dois métodos, sendo eles o sistema aquoso bifásico utilizando polietilenoglicol (1500 Da) e fosfato de sódio (20% m/m) com variação de pH (6 e 8) em 4 °C e 25 °C, e com a ultrafiltração tangencial em membranas de 10 kDa. Os resultados obtidos demonstraram que ambos os tratamentos apresentaram tolerância à faixa de temperatura de 20 a 50 °C, e pH de 4 a 8,5 a 150 minutos de exposição, com atividade relativa superior a 50%, no entanto, o fator de purificação no sistema aquoso bifásico foi maior que na ultrafiltração (34,74 e 6,55, respectivamente).

Lipases do fungo *Penicillium chrysogenum* foram purificadas com ultrafiltração em combinação com colunas cromatográficas de phenyl-Sepharose e coluna Sephadex, sendo no obtidos uma recuperação de 44% e fator de purificação igual a 30 (FERRER *et al.*, 2002; SAXENA *et al.*, 2003).

Menocin (2011) utilizou uma combinação do sistema aquoso bifásico formado por polietilenoglicol e tampão fosfato de potássio com o processo de separação por membrana, na purificação de lipase de *Penicillium crustosum*. Como resultado, obteve um fator de purificação em termos de atividade de hidrólise menor, porém com relação à atividade de transesterificação obteve um aumento.

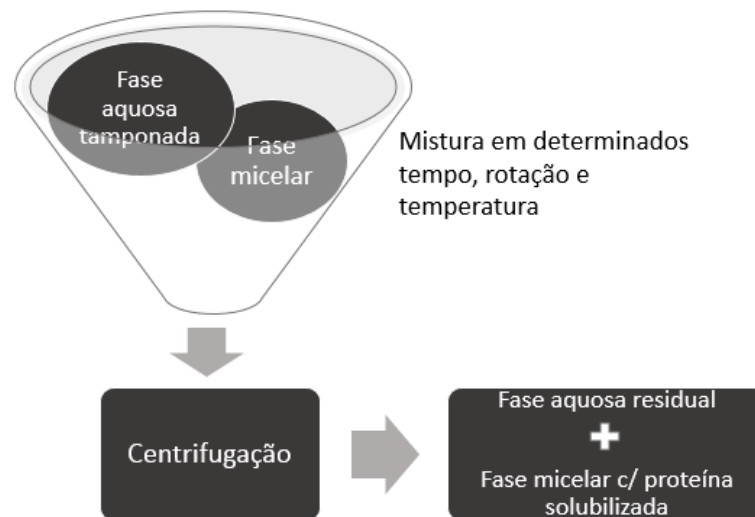
#### **4.4.5. Micelas Reversas**

Micelas são agregados de moléculas de tensoativos que se formam espontaneamente no seio da solução, após atingirem certa concentração na superfície (saturação) (BEHRING *et al.*, 2004). As micelas reversas se formam quando um tensoativo é disposto em um solvente apolar, formando agregados micelares, na qual a cabeça do tensoativo fica voltado ao centro e a cauda em contato com o solvente (YANG e ROBB, 2005).

Segundo a metodologia usada por Neira-Vielma *et al.* (2020), o sistema micelar reverso pode ocorrer da seguinte forma: Na extração direta (Figura 6) são adicionados um volume da fase aquosa tamponada (com KCl na faixa de 0 a 150 mM) e um volume igual da fase micelar (AOT em isoctano na faixa de 10 a 200 mM). A solução é então misturada por um tempo, rotação e temperatura pré-determinados, afim de solubilizar a proteína em núcleos aquosos de micelas reversas. Posteriormente, essa mistura é centrifugada para a separação de

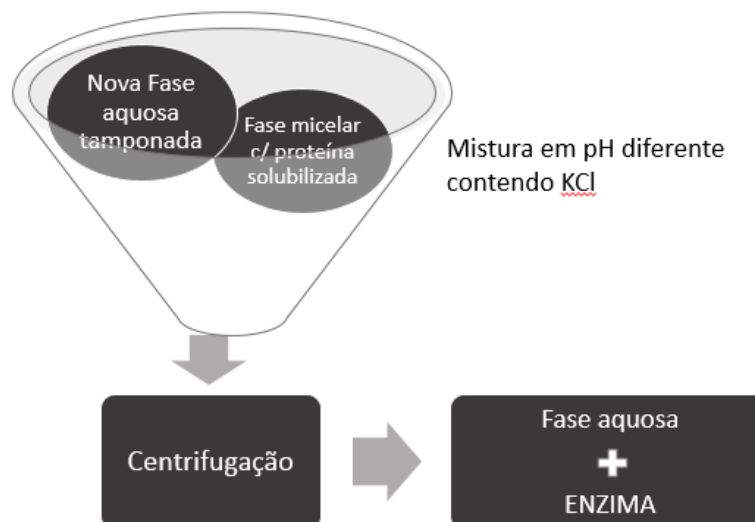
uma fase aquosa residual e uma fase micelar. Já na extração reversa (Figura 7), um determinado volume dessa fase micelar com a proteína solubilizada é adicionado a um volume equivalente de nova solução aquosa tamponada (solução de stripping fresca) em pH diferente contendo KCl variando de 0 a 300 mM. Em seguida, essa solução é agitada e centrifugada novamente para recuperar a enzima na fase aquosa (solução de separação).

Figura 6 – Representação do Processo de Micelas Reversas (Etapa Direta):



Fonte: Do autor (2021).

Figura 7 – Representação do Processo de Micelas Reversas (Etapa Reversa):





Fonte: Do autor (2021).

Gaikaiwari; Wagh; Kulkarni (2012) obtiveram uma purificação de 15 vezes, recuperação de 80% e concentração de 2,5 vezes da lipase de *Pseudomonas*, com tempo de processo de 45 minutos, utilizando o sistema micelar reverso usando surfactante aniônico bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio (AOT) em isooctano.

Já Neira-Vielma *et al.* (2020) utilizaram o sistema micelar reverso AOT com a enzima fitase de *Aspergillus niger*, alcançando um fator de purificação de 4,03, apresentando-se 1,15 vezes maior do que o relatado para o processo de purificação convencional.

Krieger *et al.* (1997) não conseguiram detectar a atividade da lipase de *Penicillium citrinum* somente com a purificação por micela reversa AOT em isooctano. Para tanto, foi necessário o processo de cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Phenyl Superose para a recuperação da atividade lipolítica da enzima.

Já em uma pesquisa mais recente, lipases de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* purificadas por extração reversa de micelas, obtiveram rendimento e atividade melhorada que os métodos convencionais, tendo também um fator de purificação aumentado em muitas vezes (BASHEER e THENMOZHI, 2010).

Em uma pesquisa realizada por Yu, Chu, Ji, (2003), obtiveram 100% do rendimento na extração direta, 68% do rendimento na extração inversa e 45% do rendimento da recuperação da atividade para a lipase de leveduras, pelo método de micelas reversas AOT em isooctano.

#### **4.5. Aplicações das lipases microbianas**

Lipases tem uma vasta aplicação nas indústrias desde a área farmacêutica até a de tratamento de resíduos (RANI e JAGTAP, 2019; PASCOAL *et al.*, 2018; XIAO; LI; PAN, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2016). Segundo Gandhi (1997) a indústria farmacêutica e médica podem se utilizar das lipases como biossensores e auxiliares de digestão; a indústria química na síntese de ésteres e hidrólise de gorduras; no tratamento de resíduos decompondo lipídeos presentes em efluentes; e na indústria de alimentos realizando vários processos como: hidrólise de gorduras do leite, aumento do aroma e aceleração do processo de fermentação em cervejas, desenvolvimento de aromas e redução no teor de gordura em carnes, além de transesterificação de óleos comestíveis. Também pode ser observada a aplicação dessa enzima na produção de aromas (OLIVEIRA, 2010, MACEDO; PASTORE,1997), interesterificação

enzimática para produção de gorduras zero *trans* (RIBEIRO *et al.*, 2007), e obtenção de *shortening* (RODRIGUEZ *et al.*, 2001).

Na indústria de alimentos, além de desempenhar as funções citadas anteriormente em lácteos, carnes e na fabricação de cervejas (GANDHI, 1997), a lipase tem mostrado grande potencial de aplicação em hidrólise de óleos vegetais com alto rendimento. Fungos do gênero *Penicillium* (MAROTTI *et al.*, 2017) e como emulsificante em pães (GANDRA *et al.*, 2008). Os autores concluíram que há a possibilidade de substituir o emulsificante monoglicérido por lipase em formulações de pães de forma enriquecido com fibras.

O uso de lipases fúngicas se mostrou efetivo no tratamento de resíduos oleosos. Rodrigues *et al.* (2016) avaliaram o tratamento de águas residuais oleosas e produção de biodiesel a partir desses óleos e graxas residuais. Os autores isolaram e utilizaram fungos do gênero *Penicillium* e *Rhizomucor* de diversas fontes do ambiente, concluindo que houve alta atividade lipásica extracelular e intracelular dos gêneros *Penicillium* e *Rhizomucor*, respectivamente, sendo estes promissores para o tratamento de águas residuais oleosas e como biocatalisador na produção de biodiesel a partir de resíduos oleosos.

Outra utilização na produção de biodiesel foi feita utilizando a lipase do *Rhizopus Oryzae* como catalisador da reação de transesterificação do óleo de semente de borracha não comestível. Os resultados mostraram um aumento de conversão proporcional a medida da concentração do catalisador, mostrando a eficiência dessa enzima (VIPIN *et al.*, 2016). Já Cruz *et al.* (2015) utilizaram da lipase do *Rizhomucor miehei* imobilizada em quitosana, na produção de ésteres obtidos a partir da hidrólise do óleo de Buriti para aplicação na indústria farmacêutica.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As lipases fúngica tem uma ampla gama de aplicações em diversas áreas, auxiliando nos processos industriais como nas indústrias farmacêutica, alimentícia, produção de biodiesel, tratamento de resíduos, dentre outras. O substrato de alta eficiência para a produção deste tipo de enzima por fungos filamentosos são os resíduos agroindustriais, com destaque para os farelos (de trigo, soja e cevada), bolos de óleo (de azeitona, gengibre, semente de niger, babaçu, amendoim e pinhão manso), resíduos de mamona e bagaço de cana, além de serem uma alternativa com bom custo benefício e sustentável. Foi visto que as condições ótimas de produção da lipase fúngica variam de acordo com a espécie do fungo, sendo os

maiores produtores desta enzima os fungos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp. e *Rhizomucor* sp.

As técnicas de purificação da lipase se fazem necessárias visto que, após o processo de fermentação a lipase estará misturada a outros compostos que não são de interesse. Para tanto, o estudo de uma técnica economicamente viável é importante pois a purificação é a etapa com maior custo do processo. Processos como extração líquido-líquido, cromatografia, filtração por membrana e sistema micelar reverso mostraram resultados satisfatórios na purificação de enzimas microbianas.

A extração líquido-líquido se mostrou eficiente e de baixo custo para purificação da lipase do *Penicillium candidum* com sistema aquoso bifásico. Já com o uso dos métodos cromatográficos permitem a obtenção de lipases com maior grau de pureza, sendo as técnicas mais utilizadas a cromatografia de troca iônica, filtração em gel e cromatografia de afinidade. A precipitação é um método muito utilizado em etapas de pré-purificação, sendo muitas vezes associado a outro método complementar.

No método de filtração por membrana, a purificação de lipase fúngica mais observada se deu por ultrafiltração e microfiltração, sendo alguns combinados com sistema aquoso bifásico. Já no sistema de micelas reversas os autores consultados obtiveram resultados satisfatórios para lipase de leveduras e fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo o método de micela reversa AOT em isooctano o mais utilizado.

Conclui-se que os processos de purificação de lipase fúngica abordados neste trabalho são atrativos para aplicação industrial.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHELLI, A. M. *et al.* Use of response surface methodology for partitioning, one-step purification of alkaline extracellular lipase from *Penicillium candidum* (PCA 1/TT031). **Journal of Chromatography B**. v. 1039, p. 66–73, 2016.

ALONSO, F. O. M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

ANDERSEM, T. *et al.* Isoelectric point separation of proteins by capillary pH-gradient ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1025, n. 2, p. 217-226, 2004.

AYAZ, B.; UGUR, A.; BORAN, R. Purification and characterization of organic solvent-tolerant lipase from *Streptomyces* sp. OC119-7 for biodiesel production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 4, p. 103–108, 2015.

BALDASSO, C. Concentração e purificação das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas. 2008. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BASHEER, S. A. e THENMOZHI, M. Reverse Micellar Separation of Lipases: A critical review. **Int. J. Chem. Sci.** v. 8 n. 5, 2010.

BEHRING, J. L. *et al.* Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**. V. 27, n.3, p. 492-495, 2004.

BETTELHEIM, F. A. *et al.* **Introdução à Bioquímica: Tradução da 9ª edição norte-americana**. São Paulo - SP; Cengage, 2012. 9788522126347. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788522126347/>. Acesso em: 20 Mar 2020.

BHARATHI, D.; e RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2019.

BIAZUS *et al.* Purificação de amilases de malte de Zea mays. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. V. 30, n. 1, p. 218-223, 2010.

BOHÓRQUEZ, M. A. M. Avaliação do etanol como agente precipitante de glicosil hidrolases produzidas por *Trichoderma Harzianum* P49P11. **Dissertação** (Mestrado) em engenharia química. Universidade estadual de Campinas. Campinas, 2014.

BONINE, B. M. **Produção de lipase pelo fungo *Myceliophthora* sp. F. 2.1.4, caracterização e imobilização da solução enzimática bruta**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2011.

BOSCHI, J. R. Concentração e purificação das proteínas do soro de queijo por ultrafiltração. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

CAO, X.; LIAO, L.; FENG, F. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Trichosporon* sp. and its application in enrichment of omega-3 polyunsaturated fatty acids. **LWT Food science and technology**. v. 118, p. 108-692, 2019.

CARVALHO, K. A. **Avaliação do uso de sais na precipitação de uma proteína empregada como agente antiviral**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

CARVALHO, T. *et al.* Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification. **Process Biochemistry**, 53, p. 259–266, 2017.

CASTRO, H. F. D. *et al.* Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n., p. 146-156, 2004.

CHAHINIAN, H. *et al.* Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.64, p.215-222, 2000.

CHANG, R. **Físico-Química para as ciências químicas e biológicas**. 3 ed. São Paulo, McGraw Hill, 2008, 618 p.

COELHO, A. L. S. e ORLANDELLI, R. C. Immobilized microbial lipases in the food industry: a systematic literature review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 2020.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O; COSTA J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC – UPF**, v.4, n.2, p.1-14, 2012.

CORTEZ *et al.* Potential catalytic of mycelium-bound lipase of filamentous fungi in biotransformation processes. **Quim. Nova**, V. 40, No. 1, 85-96. 2017.

COUTO, S.; SANROMAN, M. Application of solid-state fermentation to food industry – a review. **Journal of Food Engineering**, London, v. 76, n. 3, p. 291-302, out. 2006.

CRUZ, G. F. *et al.* Lipase de *rhizomucor miehei* imobilizada para produção de ésteres com aplicação na indústria farmacêutica a partir de ácidos graxos obtidos do óleo de buriti. Simpósio nacional de bioprocessos e simpósio de hidrólise enzimática de biomassas (SHEB), 2015. **Anais [...]** Campinas: Galoá, 2020.

DAMASO, M. *et al.* Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2008.

DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**, Blucher: São Paulo, 2011.

DUARTE, A. W. F. *et al.* Liquid–liquid extraction of lipase produced by psychrotrophic yeast *Leucosporidium scottii* L117 using aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, 156, pág. 215–225. 2015.

FAUSNAUGH, J.L.; REGNIER, F.E. Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. **J. Chromatogr.**, v. 359, p. 131–146, 1986.

FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2009.

FERRAZ, J.L. *et al.* Obtenção de Lipases Microbianas: Uma Breve Revisão. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, V. 20, n.1, Jan/Jun, 2018.

FERREIRA, A. E. S. **Extração de lipase em sistema PEG/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

FERRER, E. *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant formulas: Changes during heat treatment and storage. **Journal of Chromatography A**, v. 947, n. 1, p. 85-95, 2002.

GAIKAIWARI R. P.; WAGH S. A.; KULKARNI B. D. Efficient lipase purification using reverse micellar extraction. **Bioresour Technol**, 108:224-30 p. Mar, 2012.

GANDHI, N.N. Applications of lipases. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.74, n.6, p. 621-634, 1997.

GANDRA, K. M. et al. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 182-192, Mar. 2008.

GAUR, R.; HEMAMALINI, R.; e KHARE, S. K. LIPOLYTIC ENZYMES. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, 175–198. 2017.

GEOFFRY, K., e ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 14, 241–253. 2018.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Optimization of novel halophilic lipase production by *Fusarium solani* strain NFCCL 4084 using palm oil mill effluent. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology** v. 16 p. 327–334, 2018.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NÓBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. Rio de Janeiro. E-papers, 2006.

HARRISON, R. G. *et al.* **Bioseparations Science and Engineering**, Oxford University Press, New York, 432 p., 2003.

JANSON, J. C.; RYDÉN, L. Protein separation and purification. **Biotechnology**. V. 3. Rehm, H. –J e Reed, G. (editores), 617-642, 1993.

JINZENJI, D. **Desenvolvimento de processo cromatográfico para purificação de fator VIII humano. Emprego de anticorpos contra fragmentos específicos da proteína na avaliação da pureza e estabilidade durante as etapas de purificação**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

KAMANSKI, A. M. B. **Purificação de lipases fúngica com o objetivo de aplicação em tratamento de óleo residual de fritura**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Federal da Fronteira Sul –UFFS. Erechim, 2017.

KHOOTAMA, A.; PUTRI, D. N.; HERMANSYAH, H. Techno-economic analysis of lipase enzyme production from *Aspergillus niger* using agro-industrial waste by solid state fermentation. **Energy Procedia**. v. 153, p. 143-148, 2018.

KRIEGER, N. *et al.* Purification of the *Penicillium citrinum* Lipase Using AOT Reversed Micelles. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 69, p.: 77-85. 1997.

KRIEGER, N. *et al.* Cabral, Purification of a *Penicillium citrinum* lipase by chromatographic processes. **Bioprocess Engineering**. V. 20, p.:59-65. 1999.

KUMARI, A. *et al.* Biodegradation of waste grease by *Penicillium chrysogenum* for production of fatty acid. **Bioresource Technology**, 226, 31–38 p, 2017.

LEONAVICIUTE, G. *et al.* Impact of lipases on the protective effect of SEDDS for incorporated peptide drugs towards intestinal peptidases. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 508, p. 102-108, 2016.

LI Y. *et al.* Screening, purification, and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* isolated from stuffed buns steamers. **J Zhejiang Univ Sci B**. 20, 4:332-342. Apr. 2019.

LIMA, L. H. F. **Precipitação de lisozima e insulinas bovina e suína por “Salting Out” com o uso de eletrólitos voláteis**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, SP: [s.n.], 2006.

LOWE, M. E. The triglyceride lipases of the pancreas. **Journal of Lipid Research**, v. 43, p.2007-2016, 2002.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 17, n. 2, p. 115-119, Aug. 1997. Available from:[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20611997000200010&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611997000200010&lng=en&nrm=iso). Access em: 01 Mar. 2021.

MALDONADO, R. R. *et al.* Review on *Geotrichum* lipases: production, purification, immobilization and applications. **Chem. Biochem. Eng**. V. 30 n. 4, p.: 439-454. 2016.

MALDONADO, R.R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - FEA, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 2006.

MAROTTI, S, B. *et al.* Screening of species from the genus *penicillium* producing cell bound lipases to be applied in the vegetable oil hydrolysis. **Quím. Nova**, v.40 no.4. São Paulo. 427-435 p, May 2017.

MARTINS, T. S. **Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682**. Dissertação (Mestrado em Ciências da saúde) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

MEHTA, A. *et al.* The lipases and their applications with emphasis on food industry Bhubaneswar, India. Ed. Ramesh C. Ray, 2021.

MELANDER, W.; HORVATH, C. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series. Arch. **Biochem. Biophys.**, V. 183, p. 200–215, 1977.

MENG, F.; *et al.* Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): Membrane fouling and membrane material. **Water Research**, New York, v. 43, p. 1489-1512, 2009.

MENONCIN, S. **Purificação de lipases produzidas por fungo utilizando sistema aquoso bifásico e separação por membrana.** Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

MESSIAS, J. M. *et al.* Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. Semina. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MORAIS JÚNIOR, W. G. **Produção de lipase por Candida rugosa e Geotrichum candidum empregando melaço de soja.** Dissertação (Mestrado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

MULDER, M. Basic Principles of Membrane Technology. 2. Ed. **Kluwer Academic Publishers**, Netherlands, 564 p., 1996.

NEIRA-VIELMA A.A, *et al.* Recovery and purification of *Aspergillus niger* phytase from crude extract using AOT / isooctane reversed micelles. **Biotechnol Rep (Amst)**. 2020 May.

OLIVEIRA, A.C.D. *et al.* Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15, n.1, p.19-26, 2013.

OLIVEIRA, F. C. **Produção de Lipase Por *Penicillium Roqueforti* e sua Aplicação na Obtenção de Aroma de Queijo.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia aplicada) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

PANDEY, N. *et al.* Temperature dependent lipase production from cold and pH tolerant species of *Penicillium*. **Mycosphere**. V. 7 n. 10, p.: 1533–1545, 2016.

PAQUES, F. W. & MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Quím. Nova**, v. 29, n.1, 2006.

PASCOAL, A. *et al.* Review: Novel sources and functions of microbial lipases and their role in the infection mechanisms. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. V. 104, p. 119 – 126, 2018.

PENHA, E. M. *et al.* Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus Níger*. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 4, p. 755-761, Apr. 2016.

PEPPIN, S. S. L.; ELLIOT, J. A. W. Non-equilibrium thermodynamics of concentration polarization. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 92, p. 1 – 72, 2001.



PESSOA, A. R.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri. São Paulo, Manole, 2005, 444 p.

PINHEIRO, T. L. F. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada, Erechim, 2006.

PINHEIRO, T. L. F. *et al.* Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 444-450, June 2008.

PINTO, G. A. S. *et al.* Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **EMBRAPA - Comunicado Técnico Online**. Fortaleza, 2005.

PIOVANI, F. P.; MARINHO, C. M.; WATANABE, E. O. Solubilidade de imunoglobulina g em soluções de sais, p. 266-271. In: São Paulo: **Blucher**, 2014.

PORTO, T.S. *et al.* Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 7, p.716-721, 2008.

PRECZESKI, K. P. **Concentração de lipases de *aspergillus niger* por precipitação com sal e solventes orgânicos e posterior aplicação na hidrólise de óleo residual de fritura**. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS. Erechim, 2017.

RADKE, V. S. C. O. **Pré-purificação cromatográfica de DNA plasmidial por cromatografia de pseudoafinidade e tiofílica aromática**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2013.

RANI, S.; JAGTAP, S. Acceleration of Swiss cheese ripening by microbial lipase without affecting its quality characteristics. **Journal Food Science and Technology**. V. 56, p. 497–506, 2019.

RAVINDRAN, R. *et al.* A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. **Bioengineering**. v. 5, p. 93, 2018.

RAZAK, C. N. A. *et al.* Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S.l.], v. 3, p. 153–159, 1997.

REHMAN, S. *et al.* Improved catalytic properties of *Penicillium notatum* lipase immobilized in nanoscale silicone polymeric films. **International Journal of Biological Macromolecules**, 97, 279–286. 2017.

REINEHR, C. O. *et al.* Separação e concentração de lipases de *aspergillus niger* por microfiltração e ultrafiltração. simpósio nacional de bioprocessos e simpósio de hidrólise enzimática de biomassas (SHEB), 2015. **Anais[...]** Campinas: Galoá, 2015.

RIBEIRO, A. P. B. et al. Interesterificação química: alternativa para obtenção de gorduras zero trans. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1295-1300, Oct. 2007. Access on 01 Mar. 2021.

RODRIGUES, C. et al. Isolation and selection of lipase-producing fungi based on lipase activity and hydrolytic potential on soybean oil and grease trap scum. **Eng. Sanit. Ambient.** v.21 n.3 Rio de Janeiro July/Sept. 2016.

RODRIGUEZ, A. et al. Interesterification of tallow and sunflower oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 4 p. 431-436, 2001.

ROE, S. **Purification based on hydrophobicity**, in: Harris, E.L.V.; Angal, S. (Eds.), Protein purification methods: A practical approach, IRL Press, Oxford, p. 221-232, 1989.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Evaluation of lipase production using different strains of microorganisms isolated from dairy effluent through submerged fermentation. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 126-131, Mar. 2010.

SANTOS, P. S. et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **Journal of Engineering and Exact Sciences – JCEC**, V. 04 n. 02, 2018.

SARAC, N.; UGUR, A. A green alternative for oily wastewater treatment: lipase from *Acinetobacter haemolyticus* NS02-30. **Desalination and Water Treatment**. v. 57, 2016.

SAHOO, R. R. et al. Bioprospecting hot spring metagenome: lipase for the production of biodiesel. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 24, p. 3802–3809, 2016.

SALIHU, A. et al. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. **J. Molecular Catalysis B.:Enzym**, V. 69, p. 66-73, 2011.

SALIHU, A. et al. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources; Conservation and Recycling**, v. 58, p.: 36-44, 2012.

SANTOS, J.A. et al. Isolation of a lipase-producing *Trichosporon* spp and enzyme extraction by two-phase aqueous system. **Brazilian. Journal of Microbiology**, v. 38, p. 62-64, 2007.

SANTOS, T. C. et al. Purificação de lipase produzida a partir *Yarrowia lipolytica* por meio sistema aquoso bifásico e Ultrafiltração. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, V. 1, P. 1018-1025, 2015.

SARZANINI, C. **Journal of Chromatography A**, v. 850, p. 213, 1999.

SAXENA, R.K. et al. Purification strategies for microbial lipases. **J. Microbiol. Methods**, v.52, p. 1-18, 2003.

SETHI, B. K.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 47, p.: 143-149, 2016.

SHU, Z., YANG, J., e YAN, Y. Purification and Characterization of a Lipase from *Aspergillus niger* F044. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 96–101. 2007.

SILVA, R. R. e COELHO, G. D. Fungos principais grupos e aplicações biotecnológicas. INSTITUTO DE BOTÂNICA – IBt. **Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente**. São Paulo, Out. 2006.

SOUZA, T. M. *et al.* Bioprospecção de fungos filamentosos com atividade lipolítica. **Scientia Amazonia**, v. 8, n.2, p.19-20, 2019.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **Internacional Journal of Science and nature**, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.

TAN, J.S. *et al.* Extractive purification of recombinant thermostable lipase from fermentation broth of *Escherichia coli* using an aqueous polyethylene glycol impregnated resin system. **Biotech**. v. 8 n. 6, 288 p. 2018.

THAKUR S. Lipases, its sources, properties and applications: A Review. **Int J Sci Eng Res**. V. 3 n. 7: p. 1-29. 2012.

TRODLER, P. *et al.* Rational design of a new one-step purification strategy for *Candida antarctica* lipase B by ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1179(2), p. 161–167. 2008.

TURATI, D. F. M. *et al.* Thermotolerant lipase from *Penicillium* sp. section *Gracilentia* CBMAI 1583: effect of carbon sources on enzyme production, biochemical properties of crude and purified enzyme and substrate specificity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 2018.

ULKER, S.; KARAOĞLU, A. S. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. **Journal of bioscience and bioengineering**. Mai 2012.

UTAMI, T. S. *et al.* Produção do extrato seco lipase extracelular de *Aspergillus niger* pelo método de fermentação no estado sólido catalisar a síntese de biodiesel. **Energy Procedia**. 136, 41.-46 p. 2017.

VENTURA, S. P. M., e COUTINHO, J. A. P. Lipase Production and Purification from Fermentation Broth Using Ionic Liquids. **Ionic Liquids in Lipid Processing and Analysis**, 59–97. 2016.

VIPIN, V. C *et al.* Enzymatic transesterification of rubber seed oil using *Rhizopus Oryzae* Lipase. **Procedia Technology**. V. 25. 1014 – 1021 p. 2016.

WALSH, G., HEADON, D. R. Protein Biotechnology, John Wiley & Sons, **Chichester**, 371 p., 1994.

WANCURA, J. H. C. *et al.* Improving the soluble lipase-catalyzed biodiesel production through a two-step hydroesterification reaction system. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 103, p. 7805–7817, 2019.

WANKAT, P. C. **Separation process engineering**. Prentice Hall. 2006.

XIAO, F.; LI, Z.; PAN, L. Application of Microbial Lipase and Its Research Progress. **Progress in Applied Microbiology**, 2017.

YAMAMOTO, S; NAKANISHI, K; MATSUNO, R. Protein ion exchange chromatography: **Brief history of Ion-Exchange chromatography**. New York: CRC Press, 1988.

YANG, Z.; ROBB, D. A. Tyrosinase activity in reversed micelles. **Biocatalysis and Biotransformation**. V. 23, p. 423-430, 2005.

YELE, V.U.; DESAI, K. A. New thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri*; optimization of media and production conditions using statistical methods. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 175 (2), 855–869, 2015.

YU, Y. C.; CHU, Y.; JI, J. Y. Study of the factors affecting the forward and back extraction of yeast-lipase and its activity by reverse micelles. **Journal of colloid and interface science**. V. 267, P.: 60-64, November 2003.

ZHENG-YU, S.H.U.; JIANG-KE, Y.A.N.G.; YUN-JUN, Y.A.N. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus niger* F044. **Chin. J. Biotechnol.** V. 23 n. 1, p.: 96-101. 2007.

ZHOU, J., *et al.* Purification and characterization of lipase produced by *Aspergillus oryzae* CJLU-31 isolated from waste cooking oily soil. **Am. J. Food Technol**, v. 7 n. 10, p.: 596-608. 2012.

ZUÑIGA, *et al.* Review: techniques utilized in biomolecules purification process. **Process. Aliment**; v. 21, n.1, p. 61- 82, 2003.